

УДК 582.287.238:608.2

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (PLEUROTUS OSTREARUS), ОБЛАДАЮЩЕГО МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

***В.В. Сакович**, м.б.н., ассистент*

Научный руководитель – Д.Д. Жерносеков, д.б.н., профессор

Полесский государственный университет

Протеиназы животного происхождения приобрели широкое распространение в молочной промышленности, в частности при производстве сыра. Данный ресурс является весьма ограниченным

[1]. Замена дорогостоящего сычужного фермента грибными протеазами специфического действия экономически выгодна и перспективна [2]. В литературе имеются данные, что экстракт плодовых тел *P. ostreatus* имеет сходство с препаратами, используемыми в молочной промышленности, и после проведения очистки может быть применен в сыроделии [3].

Целью данной работы было изучение некоторых физико-химических и биологических свойств полученного ранее ферментного препарата из *P. ostreatus*.

Материалы и методы. Культивировали *P. ostreatus* в картофельно-сахарозной среде. Инкубировали в течение 14 дней в темноте при температуре 27 °С при 70 об/мин. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически. За единицу молокосвертывающей активности (МСА) принимали количество фермента, сворачивающее 100 мл молока за 40 мин при 35 °С. Протеолитическую активность (ПА) определяли по методике, описанной Leighton et al. Фракция, содержащая протеиназу, была получена из культуральной жидкости осаждением хлоридом натрия с последующим диализом и концентрированием. Желатиназную и молокосвертывающую активность определяли стандартными методами. Белковый компонент фракции изучали с помощью методов ВЭЖХ, электрофореза по Лэммли и MALDI-TOF анализа. Протеиназная активность изучалась энзим-электрофорезом. Для изучения специфичности действия протеиназы использовали ряд хромогенных субстратов: S2238, S236, S2251, S2765, Leu-pNa, Ala-pNa и S2302. Ингибиторный анализ проводили с использованием ЭДТА, бензамидина, ФМСФ, ПХМБ.

Влияние pH. Протеолитическая активность ферментного препарата из *P. ostreatus* наблюдалась во всем исследуемом диапазоне pH от 3,6 до 8,0. При этом pH оптимум протеолитической активности находится при значении pH=7,0.

По сравнению с протеолитической, молокосвертывающая активность ферментного препарата наблюдалась в более узком диапазоне pH от 3,6 до 5,6. pH оптимум ферментного препарата, обладающего МСА, представлен двумя пиками при pH 3,6 и pH 5,0.

Влияние температуры. С целью исследования физико-химических свойств молокосвертывающих протеиназ экстракта плодовых тел вешенки обыкновенной мы изучили влияние температуры на молокосвертывающую и протеолитическую активность ферментного препарата. Также для изучения термостабильности мы провели преинкубацию ферментного препарата. Температурные оптимумы для ПА и МСА оказались разными. Протеолитическая активность ферментного препарата из *P. ostreatus* наблюдалась во всем исследуемом диапазоне температур от 25 до 60 °С. При этом температурный оптимум протеолитической активности находится при 45°С.

При изучении термостабильности протеиназ из экстракта плодовых тел вешенки было установлено, что МСА сохраняется до 55 °С при pH 5. Дальнейшее повышение температуры резко инактивирует молокосвертывающие ферменты изучаемого гриба. При 4 °С МСА раствора лиофильного порошка сохраняется на одном уровне в течение месяца. Как видно из рисунка 2 и 3, в процессе часовой преинкубации наблюдается увеличение ПА и МСА ферментного препарата минимум в 2 раза. Данное явление обнаружено ранее для ферментного препарата, содержащего МСА из плодовых тел *P. ostreatus*.

Влияние ионов кальция. Максимальная активность свертывания молока в наших исследованиях была самой высокой при добавлении в субстрат (молоко) хлорида кальция в конечной концентрации 10 mM.

Молекулярная масса. С помощью метода HPLC был найден основной белковый компонент и некоторые минорные белки. Согласно результатам электрофореза, основной белковый компонент фракции имеет молекулярную массу 45 кДа. Был проведен энзим-форез с использованием фибриногена в качестве стандартного субстрата. Было показано, что протеиназная активность фракции присутствовала в зоне, соответствующей 45 кДа.

Субстратная специфичность. Амидолитическую активность частично очищенного ферментного препарата оценивали с помощью нескольких хромогенных субстратов. Фермент имеет более высокую специфичность к субстрату Leu-pNa.

Ингибиторный анализ. Мы изучили эффект различных ингибиторов на амидолитическую активность (в качестве субстрата использовали Leu-pNa). Очищенный энзим из культуральной жидкости вешенки обыкновенной был ингибирован 10 mM ЭДТА, широко известным ингибитором металлопротеаз.

Таким образом, частично очищенный препарат из культуральной жидкости *P. ostreatus* охарактеризован для промышленного использования, в качестве молокосвертывающего фермента:

- рекомендуемое значение pH 3,6;
- рекомендуемая температура 35°С;

- для увеличения МСА мы рекомендуем проведение часовой преинкубации ферментного препарата.

Молекулярная масса полученного очищенного препарата составляет 45 кДа.

Список использованных источников

1. Emmons, D. B. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. Journal of Dairy Science, 1990, 73(8), 2016-2021.
2. Preetha, S., Boopathy, R. Influence of culture conditions on the production of milk-clotting enzyme from Rhizomucor. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1994, 10, 527-530.
3. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскуряков, М.А. Кожухова // Пищевая химия, 2008 – 114 с.